Aus dem Institut für Veterinär-Hygiene
der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

Direktor: Prof. Dr. H. Hartwigk

ZUR FRAGE DER HALTBARKEIT DER HUEHNERPOCKEN - IMPFSTOFFE AUF TAUBENPOCKENVIRUSBASIS

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

Vorgelegt von
Dieter Stottmeier
aus Magdeburg

Berlin 1962
Journal-Nr. 360

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548014_0046

Aus dem Institut für Veterinär-Hygiene
der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

Direktor: Prof. Dr. H. Hartwigk

ZUR FRAGE DER HALTBARKEIT DER HUEHNERPOCKEN - IMPFSTOFFE AUF TAUBENPOCKENVIRUSBASIS

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

Vorgelegt von
Dieter Stottmeier
aus Magdeburg

Berlin 1962
Journal-Nr. 360

Gedruckt mit Genehmigung
der Veterinärmedizinischen Fakultät
der Freien Universität Berlin

Dekan:	Prof. Dr. L. F. Müller
Referent:	Prof. Dr. H. Hartwigk
Korreferent:	Prof. Dr. Dr. M. Lerche

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Tag der mündlichen Prüfung: 23. 2. 1962

Tag der Promotion: 8. MAI 1962

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Einleitung	4
Literatur	6
Eigene Untersuchungen	24
I. Material	25
II. Technik	
1. Impfstoffherstellung	25
2. Impftechnik	27
3. Titration der Impfstoffe an der Chorio-Allantois-Membran des bebrüteten Hühnereies	28
III. Ergebnisse	29
1. Testung am Huhn	
A. Der lyophilisierte Impfstoff (LY)	29
B. Der Trockenimpfstoff (TR 1)	31
C. Der Trockenimpfstoff (TR 2)	33
2. Testung am bebrüteten Hühnerei	34
Besprechung	36
Zusammenfassung	42
Literaturverzeichnis	44

E i n l e i t u n g

Seit über 30 Jahren wird für die Bekämpfung des Pocken - Diphteroids der Hühner die prophylaktische Vakzination als das Mittel der Wahl angesehen. Jedoch sind die Meinungen über die Indikation der einzelnen Impfstoffe und die Art ihrer Gewinnung, namentlich ihrer Konservierung und Aufbewahrung, nicht einheitlich.

Das Ziel der Impfstoffgewinnung ist, einen Impfstoff mit hohem Antigengehalt herzustellen und ihn so aufzubewahren, daß eine Minderung seines Virusgehaltes nicht erfolgt.

Die Vermehrung des Taubenpockenvirus (T-Virus) geschah ursprünglich nach den Anweisungen von ZWICK (34) und BAUMANN (2) auf der Brusthaut der lebenden Taube. An die Stelle dieses Verfahrens trat in den vierziger Jahren die Vermehrung des T-Virus auf der Chorio-Allantois-Membran (CAM) des embryonierten Hühnereies. Erfolgversprechende Versuche, das Virus in der Gewebekultur zu züchten, haben in neuester Zeit die Entwicklung eines Gewebskultur-Impfstoffes ermöglicht.

Da für die handelsüblichen Hühnerpockenimpfstoffe auf T-Virus-Grundlage von den Herstellern sehr verschiedene Angaben über die Haltbarkeit gemacht werden, wurde mir die Aufgabe übertragen festzustellen, wie lange sich ein aus einem T-Virus-Stamm hergestellter lyophilisierter Hühnerpockenimpfstoff und ein aus demselben Stamm hergestellter im Vakuum über einem hygroskopischen Stoff getrockneter Hühnerpockenimpfstoff ohne

Verlust an antigener Substanz aufbewahren lassen. Beide Impfstoffe sollten im Vakuum und bei einer Kühlschranktemperatur von +4° C aufbewahrt und einer intrafollikulären Testung am Huhn unterzogen werden.

Literatur

Die Frage der Dauer einer gleichbleibenden antigenen Wirksamkeit eines lyophilisierten und eines über einem hygroskopischen Chemikal im Vakuum getrockneten Hühnerpockenimpfstoffes steht engstens mit der Fähigkeit des Virus in Zusammenhang, austrocknenden Einflüssen und Einwirkungen bestimmter Temperaturen, die bei der Aufbewahrung vorherrschen, zu widerstehen.

Es erscheint deshalb notwendig, eine kurze Uebersicht über die mir in der Literatur zugänglichen wissenschaftlichen Arbeiten, soweit sie die Frage der Tenazität des Virus behandeln, zu geben.

BURNET (7) verteilte eine fein zerriebene Präparation eines H-virushaltigen Gewebes auf gläsernen Objektträgern und ließ das Material langsam auf diesen eintrocknen. Er stellte fest, daß das Virus noch nach 15 Monaten infektiöse Eigenschaften besaß. Wurde das Virus im Vakuum über Schwefelsäure getrocknet, so war seine Aktivität noch nach 12 Monaten vorhanden.

VAN HEELSBERGEN (19) vermochte das H-Virus in den Epithelzellen der Hühnerhaut - und Schleimhaut bei diffusem Tageslicht wochenlang in infektiösem Zustand zu erhalten. Bei Aufbewahrung des infektiösen Materials im Vakuum war die Infektiosität davon abhängig, welche Temperaturen bei der Aufbewahrung herrschten. Betrug diese +30° C, so verlor das Virus nach Monaten seine Aktivität. Nach VAN HEELSBERGEN kann

das Virus jahrelang infektiös bleiben, wenn es bei 0° C im Vakuum aufbewahrt wird.

COULSTON und MANWELL (9) wiesen nach, daß das Kanarienvogelpockenvirus bei Aufbewahrung in getrockneter Form 7 Monate lang virulent blieb und erst nach 12 Monaten seine Virulenz eingebüßt hatte.

BEAUDETTE (3) gewann von einer Pute Hautpockenmaterial und ließ es eintrocknen, um es dann im Kühlschrank aufzubewahren. Etwa 8 Jahre später prüfte er das Virus auf seine infektiösen Eigenschaften. Es ergab sich, daß mit dem Virus Hühner noch infiziert werden konnten.

In Zusammenarbeit mit anderen Autoren (4) züchtete BEAUDETTE die Erreger der infektiösen Laryngotracheitis und infektiösen Bronchitis der Hühner, sowie das H-Virus, das T-Virus und das Kanarienvogelpockenvirus auf der CAM embryonierter Hühnereier. Alle Viren waren eiadaptiert. Das infektiöse Material sämtlicher Viren wurde lyophil getrocknet und im Vakuum bei Eisschranktemperatur von +4° C aufbewahrt. Es zeigte sich, daß ein Virusstamm der infektiösen Laryngotracheitis bei dieser Aufbewahrung noch nach 3359 Tagen, ein anderer Virusstamm nach 972 Tagen infektiös war. Bei gleicher Aufbewahrung war bei einem H-Virusstamm die Virulenz noch nach 3598 Tagen, bei einem T-Virusstamm nach 3605 Tagen und bei einem Kanarienvogelpockenvirus nach 2571 Tagen erhalten. Die Infektiosität der Erreger der infektiösen Bronchitis blieb unter gleichen Bedingungen 684 Tage lang erhalten.

Daß das H-Virus gegenüber austrocknenden Einflüssen eine erhebliche Tenazität besitzt, stellte auch CUNNINGHAM (10) fest. Er bezeichnete die Widerstandsfähigkeit des H-Virus gegen Austrocknung als eine seiner charakteristischen Eigenschaften. Das Virus hat die Fähigkeit längere Perioden zu überleben, wenn es bestimmten klimatischen Bedingungen, beispielsweise Trockenheit, Feuchtigkeit und Lichteinfall, namentlich während der verschiedenen Jahreszeiten, ausgesetzt worden ist. Feuchte Hitze zerstörte es leicht, aber die Resistenz des Virus gegen eine Austrocknung war ein wichtiger Faktor bei dem Ueberleben des Virus unter natürlichen Bedingungen.

Umfangreiche Versuche über die Haltbarkeit des T-Virus in getrockneter Form führte VAN ZWOL (35) durch.

Das eingetrocknete, virushaltige Material stammte von infizierten Eihäuten embryonierter Hühnereier und war im Vakuum getrocknet worden.

Wurde dieses Material ohne Vakuum bei einer Temperatur von +37° C aufbewahrt, so war das Virus nach 1 Monat inaktiviert. Lagerte es jedoch bei Zimmertemperatur, ohne Vakuum und bei einem diffusen Tageslicht, so war das Virus nach 3 Monaten inaktiviert. Diese Haltbarkeitsfrist ließ sich um 14 Tage verlängert, wenn der Tageslichteinfall vermieden wurde.

Wurde das im Vakuum getrocknete Virusmaterial im Vakuum bei +37° C aufbewahrt, so war das Virus erst nach 3 Monaten völlig inaktiviert. Die infektiöse Wirksamkeit auf Eimembranen bebrüteter Hühnereier büßte das T-Virus des Trockenmaterials

zu 50 % bei 4-monatiger Aufbewahrung bei Zimmertemperatur, im Vakuum und bei diffusen Tageslicht ein.

Die Haltbarkeit war erhöht, wenn das getrocknete Virusmaterial im Vakuum und im Eisschrank bei+4° C und ohne Tageslicht aufbewahrt wurde. Die Wirksamkeitsverluste des T-Virus im Trockenmaterial wurden durch Titrationen auf bebrüteten Hühnereiern festgestellt.

RICHTER (30) infizierte die CAM von bebrüteten Hühnereiern mit einem T-Virusstamm. Die mit Pockenherden behafteten CAM wurden tief gefroren (-80° C) und dann in einem Vakuum - Exsiccator über einem hygroskopischen Stoff getrocknet. Bei der Prüfung des Impfstoffes auf der CAM der 12 Tage lang bebrüteten Hühnereier kam es nach 3 Tagen zur Entstehung von Pockenherden auf den CAM. Die Ampullen dieses Impfstoffes wurden unter einem Vakuum von 0,02 mm Hg luftdicht zugeschmolzen. In dieser Form erwies sich der Impfstoff noch nach 3 - jähriger Lagerung bei Zimmertemperatur wirksam, denn er bewirkte bei Verimpfung an Junghühner ein Angehen der Impfpocken. Wenn der Impfstoff unter Stickstoff in den Ampullen zugeschmolzen wurde, zeigte er noch nach 2 1/2 - jähriger Aufbewahrung bei Zimmertemperatur eine immunogene Wirksamkeit. Wurde der Trockenimpfstoff bei Zimmertemperatur und ohne Vakuum aufbewahrt, dann war das T-Virus nach wenigen Monaten inaktiviert. Bei Lagerung der evakuierten Impfstoffampullen bei+37° C, erwies sich der Impfstoff nach 1 Monat als unbrauchbar.

Aus dem Schrifttum geht hervor, daß die bei der Aufbewahrung

herrschenden Temperaturen auf die Aktivität der Geflügelpockenviren einen erheblichen Einfluß ausüben.

Vom H-Virus werden höhere Hitzegrade nur über eine kurze Zeit vertragen. Nach VON REISCHAUER (29) widerstand das H-Virus 15 bis 30 Minuten einer trockenen Hitze bei +80° C und 5 Minuten einer feuchten Hitze bei 100° C.

BURNET (7) bewahrte Suspensionen des H-Virus in Wasser oder physiologischer Kochsalzlösung in verschlossenen Glasampullen auf und konnte das enthaltene Virus innerhalb von 8 Minuten bei +60° C inaktivieren. Hingegen war das Virus noch nach 90 Minuten aktiv, wenn es im infektiösen Pocken- und Hautmaterial, und noch nach 30 Minuten aktiv, wenn es als fein gepulvertes Material auf +60° C erhitzt wurde.

Wurde infektiöses Pockenmaterial in Agar eingebettet und bei +38° C aufbewahrt, dann war das Virus noch nach 14 Tagen infektiös. In einer wässrigen Virussuspension konnte BURNET das H-Virus 60 Tage bei +6° C, 30 Tage bei +22° C, 6 Tage bei +25° C und 3 Tage bei +37° C aufbewahren. Das H-Virus war nach einer 8 tägigen Lagerung bei +37° C völlig inaktiviert.

GRAHAM und BERGER (13) fanden, daß das H-Virus in einer 1 %igen wässrigen Suspension auf sterilen Leinenläppchen an den Füßen und am Flaum von Eintagsküken, die sich im Brutschrank befanden, nach 30 Minuten, oft nach 45 bis 50 Minuten noch infektiös war. Nach 90 Minuten war das Virus inaktiviert. Die Infektiosität einer Virussuspension, die 30 und 45 Minuten lang zerstäubt wurde, ging nicht verloren, wie durch Infektionsversuche an empfänglichen Küken gezeigt

werden konnte.

MC CULLOCH (24) beobachtete, daß eine H-Virussuspension von 100 000 infektiösen Dosen in FDA-Brühe (Food and Drug Administration) in 5 Minuten bei +60° C und in 15 bis 20 Minuten bei +55° C inaktiviert wurde. Bei einer Temperatur von +50° C blieb das Virus länger als eine Stunde aktiv.

VAN ZWOL (35) suspendierte das von infizierten Eihäuten bebrüteter Eier gewonnene taubenpockenvirushaltige Material in Nährbouillon. Das T-Virus war nach 5 Tagen völlig inaktiviert, wenn die Bouillon bei 37° C im Brutschrank gelagert wurde. Es behielt dagegen seine infektiöse Wirksamkeit 4 Wochen, wenn es in der Bouillon bei Zimmertemperatur und unter Einwirkung von diffusem Tageslicht aufbewahrt wurde. Inaktiviert wurde das Virus aber, wenn es 145 Tage in Bouillon bei Zimmertemperatur und ohne Einwirkung von Tageslicht aufbewahrt wurde.

Eine Temperatur von +4° C schonte das Virus am meisten, da es bei dieser Temperatur noch nach 160 Tagen einen gewissen Teil seiner Aktivität besaß. Die Haltbarkeitsfrist war verkürzt, wenn das in Bouillon suspendierte T-Virus bei -17° C gelagert wurde. Da in diesem Fall der Wasseranteil der Bouillon gefror, erhöhte sich die Konzentration, so daß die Aktivität des Virus vermindert wurde.

Die Wirksamkeitsverluste des T-Virus wurden wie bei den Versuchen mit Trockenmaterial durch Titrationen an bebrüteten Hühnereiern festgestellt.

Zwecks Herstellung von Hühnerpockenimpfstoffen aus originärem H-Virus infizierten CORDIER-BOULLANGIER und Mitarbeiter (8) die CAM 10 Tage lang bebrüteter Hühnereier mit den H-Virusstämmen "Tunis" und "Nice", indem sie 0,02 ml einer wässrigen Virussuspension auf die CAM übertrugen. Die mit Pockenherden behafteten Eihäute wurden 6 bis 7 Tage p.i. geerntet. Sie wurden dann unter sterilen Bedingungen nach Zerkleinerung im Mörser mit Glaspulver zerrieben und mit Aqua dest. im Verhältnis 1:34 verdünnt, um die überstehende Flüssigkeit in Ampullen zu füllen. Nach dem Verschluß der Ampullen wurden diese bei -20° C aufbewahrt. Als mit dem Impfstoff 5 Monate nach seiner Herstellung die CAM embryonierter Eier infiziert wurden, konnten 6 Tage p.i. Pockenherde auf den Eimembranen nachgewiesen werden.

FRITZSCHE und GERRIETS (11) geben an, daß das H- und T-Virus, in eiweißreichen Zellmedien eingeschlossen, eine starke Resistenz gegenüber hohen Temperaturen besitzen. Die Viren widerstehen 8 Minuten lang einer Erhitzung auf +60° C.

MAYR und KALCHER (23) berichteten über Versuche für optimale Virusernten aus den Zellgewebskulturen. Sie zeigten, daß das H- und T-Virus bevorzugt in den virusproduzierenden Zellen zurückgehalten wurden. Zur Aufschließung des Virus aus den Zellen war die Ausschüttelung der infizierten Gewebskulturen mit Glasperlen oder Sand dem Einfrieren des Materials bei -60° C und Auftauen bei +20° C nicht überlegen. Man erhielt gute Virusernten für die Antigen- oder Impfstoffherstellung, wenn so viel Virus in die Gewebskultur verimpft wurde, daß

möglichst sofort alle Zellen gleichmäßig infiziert wurden. Wenn zu wenig Virus in die Gewebskultur gegeben wurde, waren mehrere Vermehrungszyklen notwendig, um alle Zellen infizieren zu können. Da die Zyklen aber mehrere Tage dauerten, sammelte sich nie genügend Virus an, weil das in den ersten Vermehrungszyklen produzierte Virus durch die Brutschrankwärme teilweise wieder inaktiviert wurde, ehe neues Virus entstand.

LOEWENTHAL (21) setzte das H-Virus einer Radiumbestrahlung aus, nach einer 330 Minuten langen Bestrahlung war das Virus noch aktiv.

GRAHAM und Mitarbeiter (15) bestrahlten das H-Virus in einer wässrigen Suspension mit harten Röntgenstrahlen in Dosen von 888 r Einheiten, sie erzielten damit keinen Effekt auf das Virus. Das Virus wurde aber inaktiviert durch UV-Strahlen in 2 Stunden bei einem Abstand von 20 cm, es wurde abgeschwächt, wenn es 15 bis 20 Minuten dem UV-Licht ausgesetzt worden war. Wurde Methylenblau in einer Konzentration von 1:50 000 zugegeben, so reduzierte sich die für die Inaktivierung erforderliche Zeit um 5 Minuten, während eine merkliche Abschwächung des Virus bei 2 1/2 Minuten langer Bestrahlung festzustellen war.

Umfangreiche Untersuchungen über die Resistenz der Geflügelpockenviren gegenüber Chemikalien und Desinfektionsmitteln sind im Laufe der Zeit durchgeführt worden.

MARX und STICKER (22) stellten aus infektiösem Hühnerhaut-

Material eine H-Virussuspension in physiologischer Kochsalzlösung her. Sie setzten dieser Suspension eine 1 %ige Phenollösung zu. Das Virus war noch nach 80 Minuten infektiös. Bei einer 2,5 %igen Phenollösung wurde das Virus innerhalb von 80 Minuten inaktiviert.

Nach VON REISCHAUER (29) verlor das H-Virus in 5 Minuten seine Infektiosität, wenn eine 1 %ige Kalilauge oder 1 %ige Essigsäure oder einpromillige Sublimatlösung eingewirkt hatte.

BURNET (7) bewahrte eine fein gepulverte Virussuspension, die mit Glyzerin zu gleichen Teilen vermischt worden war, bei +30° C auf, und stellte fest, daß das enthaltene Virus noch nach 120 Tagen aktiv war. Das Glyzerin hatte offenbar eine bakteriostatische Wirkung, da nur sehr wenige Keime nach 60 Tagen in der Suspension entdeckt werden konnten.

LOEWENTHAL (21) stellte eine Emulsion aus Hautpockenmaterial her, die er mit einer 1 %igen Phenollösung versetzte. Das H-Virus war noch nach 80 Minuten aktiv.

VAN HEELSBERGEN (19) ist der Meinung, daß das in Glyzerin suspendierte H-Virus im Eisschrank jahrelang aufbewahrt werden kann.

GRAHAM und BRANDLEY (14) ließen Desinfektionsmittel auf eine 1 %ige wässrige Virussuspension bei +4° C 48 Stunden lang einwirken. Das Virus wurde in dieser Zeit durch eine 0,025 - 0,5 %ige Formalinlösung, durch eine 0,5 %ige Phenollösung,

durch eine 2 %ige Saponinlösung und durch eine 0,5 %ige Trikresollösung inaktiviert.

MC CULLOCH (24) berichtet, daß 95 und 75 %ige Lösungen von Aethylalkohol das H-Virus in weniger als 10 Minuten inaktivieren. Eine 50 %ige Lösung inaktiviert das Virus in 30 Minuten, eine 25 %ige ist ohne jede Wirkung. Die Testungen wurden bei +20° C und mit 1000 infektiösen Dosen ausgeführt. Die Nährbodenbrühe, in der das Virus getestet wurde, hatte einen pH von 7,0. Das Virus widerstand 20 Minuten einer 3 %igen Formaldehydlösung bei +20° C, die Inkubationszeit des Virus war jedoch nach der Behandlung verlängert.

Eine im Handel erhältliche einpromillige Hexylresorcinollösung in einer Verdünnung von 1:4 inaktivierte das Virus, bei einer Verdünnung von 1:8 blieb das Virus infektiös.

Eine 1:400 verdünnte Jodlösung inaktivierte das H-Virus, eine Verdünnung von 1:800 jedoch nicht.

Eine 1 %ige Lösung von Merkurochrom war ohne Wirkung auf das Virus, hingegen inaktivierte eine 2 %ige Lösung bei +20° C und einem pH von 7,0 das Virus. Einer 3 %igen Phenollösung, die 10 Minuten lang bei +20° C einwirkte, widerstand das Virus. Die gleiche Lösung inaktivierte aber das Virus innerhalb von 30 Minuten. Während eine 1:500 verdünnte Natronlauge das Virus in 10 Minuten bei +20° C inaktivierte, blieb eine 1:600 verdünnte Natronlauge ohne desinfizierende Wirkung auf das Virus.

Wurde das Virus in FDA-Brühe (Food and Drug Administration)

bei einem pH von 7,0 und bei +20° C suspendiert, so inaktivierte eine einpromillige Kristallviolett-Lösung das Virus in 10 Minuten, ebenso eine 1:50 verdünnte Acriflavin-Lösung.

Wenn eine 1:400 verdünnte Cresolseifenlösung zugesetzt wurde, verlor das Virus in 10 Minuten bei +20° C seine Infektiosität, aber nicht in 5 Minuten. Bei +40° C hatte eine 1:5000 verdünnte Lösung auf das Virus die gleiche Wirkung wie eine 1:400 verdünnte bei +20° C.

VAN ZWOL (35) suspendierte T-virushaltiges Material, das von infizierten Eihäuten bebrüteter Hühnereier gewonnen worden war, in einer verdünnten Glyzerinlösung. Das T-Virus war innerhalb von 24 Stunden inaktiviert, wenn es in der Glyzerinsuspension bei +37° C aufbewahrt wurde. Einen kontinuierlichen Abfall des Virustiters beobachtete VAN ZWOL während 12 Tagen, wenn die Suspension bei Zimmertemperatur und in einem diffusen Tageslicht aufbewahrt wurde. Die infektiöse Wirksamkeit der Suspension war zu 75 % geschwunden, wenn sie 5 Wochen lang im Eisschrank bei +4° C gelagert wurde. Wenn die Glyzerinsuspension des T-Virus bei -17° C aufbewahrt wurde, verminderte sich die Aktivität des Virus innerhalb von 4 Wochen um 50 %. Auch hier wurden die Wirksamkeitsverluste des T-Virus durch Titrationen an bebrüteten Hühnereiern festgestellt.

BRYAN (6) wies anhand seiner Untersuchungen nach, daß die Aufbewahrung des H-Virus in 50 %igem gepuffertem Glyzerin der Aufbewahrung in Mineralöl überlegen war.

Eine 5 %ige wässerige Viruscuspension, die in einer 50 %igen

gepufferten Glyzerinlösung emulgiert wurde, behielt bei einer Lagerung bei +14° C ihre infektiöse Wirksamkeit 8 Monate und bei einer Lagerung bei+5° C 25 Monate.

FRITZSCHE und GERRIETS (11) sprechen von einer hohen Resistenz des H- und T-Virus gegenüber Desinfektionsmitteln.

Die Viren wurden in jedem Fall sicher abgetötet, wenn sie 5 Minuten unter Einwirkung einer 1-2 %igen Natronlauge, Kalilauge oder Sulfoliquidlösung standen oder wenn sie einer einpromilligen Sublimatlösung 5 Minuten lang ausgesetzt worden waren.

Nach ROBBINS (31) hatte weder Penicillin noch Patulin einen Effekt auf das H-Virus, wie das bei Testungen an den infizierten CAM embryonierter Hühnereier gezeigt werden konnte.

Für die vorliegende Arbeit, die sich mit der Haltbarkeit getrockneter Hühnerpockenimpfstoffe auf T-Virusgrundlage beschäftigt, sind die Untersuchungen der Japaner TSUBAHARA und Mitarbeiter (32) von besonderem Interesse.
Die Autoren stellten sich aus Eihäuten, die mit einem T-Virusstamm bei 11 Tage bebrüteten Hühnereiern beimpft worden waren und 6 Tage p.i. geerntet worden waren, einen Impfstoff her. Die Eihäute wurden zu einer 20 %igen Emulsion mit Hornibrook-Gebhard-Lösung verarbeitet und durch ein Drahtsieb gegeben, ehe sie in Ampullen gefüllt und lyophil getrocknet wurde. Nach dem Trocknen erfolgten die Evakuierung der Ampullen im Exsiccator über Phosphorpentoxyd und das Verschließen der Am-

pullen. Vor Gebrauch wurde der lyophilisierte Impfstoff in einer 1 %igen Glyzerinlösung resuspendiert, wobei 4 ml des Orginalvolumens mit 20 ml Glyzerinlösung aufgenommen wurden. Der Impfstoff blieb bei +2-5° C 13 Monate lang im Kühlschrank liegen, er wurde nach dieser Zeit in verschiedenen Intervallen auf seine Infektiosität auf der CAM bebrüteter Eier und auf seine impfpockenerzeugende und immunisierende Eigenschaft am Huhn geprüft. Zur Bestimmung der Ei-ID $\overline{50}$ wurde der resuspendierte Impfstoff 5 Minuten bei 2500 T/Min. zentrifugiert. Mit dem Ueberstand wurden 10 fache Verdünnungen von 10^{-2} bis 10^{-6} hergestellt, 0,1 ml jeder Verdünnungsstufe wurde auf die CAM von 4 bis 5 Eiern gebracht, die 11 Tage lang bebrütet worden waren. Als Virustiter wurde diejenige Verdünnung zugrunde gelegt, die noch 5 bis 9 Pockenherde auf der CAM hervorrief. Die impfpockenbildende Wirksamkeit wurde an Junghühnern mittels der Federfollikelimpfung geprüft. Die an den Impfpocken auftretenden Erscheinungen der Entzündung, Schwellung und des Abheilens, sowie der Allgemeinzustand der Impflinge gaben Hinweise für die Infektiosität. Milde Reaktionen bei ausgeprägter Impfpockenbildung galten als Zeichen eines wirksamen und nicht virulenten Impfstoffes. Die Impfpocken waren in der Regel am 6. bis 8. Tag p.v. optimal ausgebildet und innerhalb von 14 Tagen völlig verschwunden.

Zwecks Prüfung auf immunogene Eigenschaften wurden 3 bis 4 Junghühner mit der Vakzine geimpft, die bei +2-5° C 10 Monate aufbewahrt worden war. Drei gleichaltrige Hühner blieben als Kontrollen ungeimpft. Eine Testinfektion wurde mit infektiöser Hautsuspension eines virulenten H-Virus (Nishigahara-Stamm) 4 Monate p.v. durchgeführt. Es zeigte sich, daß bei allen

vakzinierten Tieren nur schwache Reaktionen mit Schwellung der Follikel, die einige Tage dauerte, auftraten, während die nicht vakzinierten Kontrolltiere schwere Reaktionen aufwiesen. Die 10 Monate aufbewahrte Vakzine war noch imstande eine solide Immunität von mehr als 4 Monate langer Dauer hervorzurufen.

In verschiedenen Hühnerfarmen von Tokio und Chiba wurden von Juli bis September 1956 und 1957 Feldversuche mit Impfstoffen, die 1 Monat, 3 und 12 Monate bei + 2-5° C in lyophilisiertem Zustand aufbewahrt worden waren, durchgeführt. Die Mehrzahl der Tiere zeigte gute Impfreaktionen, und zwar unabhängig von der Dauer der Aufbewahrung der Impfstoffe. Die Impfreaktionen blieben nur bei 1,1 % der Impflinge aus. Der Gesundheitszustand war gleichbleibend gut, ebenso die Eierproduktion. Nachdem die Seuche jahreszeitliche Höhepunkte erreichte, kam es bei den vakzinierten Tieren, abgesehen von 2 % oder weniger Impflingen mit einzelnen Pockenreaktionen, zu keinen Erkrankungen, während 50 % oder mehr der nicht geimpften Hühner erkrankten. Bei diesen Versuchen wurden auch 1 bis 14 Tage alte Küken durch die Follikelmethode am Rücken in einer Ausdehnung von 1 qcm vakziniert. Die Impfpocken gingen gut an.

Die Impfstofftitrationen ergaben bei frisch hergestellter Vakzine einen Titerspiegel von 10^{-5}; nach einer einjährigen Aufbewahrung bei + 2-5° C fiel der Titer auf 10^{-3} ab.

Die gleiche Wirksamkeitsverminderung wurde festgestellt, wenn der Impfstoff 6 Monate lang bei Zimmertemperatur oder 3 Monate lang bei + 37° C aufbewahrt worden war.

Erst kürzlich veröffentlichte Versuchsergebnisse, die GOLDHAFT

(12) an H- und T-Viren bei langjähriger Aufbewahrung bei +4-5° C erzielte, haben für meine Arbeit ferner Bedeutung.

GOLDHAFT bewahrte natürliches Hautpockenmaterial, das vom Kamm des Huhnes oder von der Brusthaut der Taube gewonnen worden war, in luftgetrocknetem Zustand nach Vermörserung auf. Vorher war die Masse gesiebt, gewogen und in Fläschchen verbracht worden, die mit Gummistopfen luftdicht verschlossen wurden. Das Trockenmaterial wurde später in Glyzerin-Kochsalz-Lösung aufgenommen und in dieser Form als Impfstoff bei Hühnern und Tauben verwendet, um die impfpockenerzeugende Wirksamkeit festzustellen.
Das vor 1939 eingelagerte Material stammte stets von Hühnern oder Tauben. Vom Jahre 1939 ab handelte es sich ausschließlich um H- und T-Viren, die über die CAM embryonierter Hühnereier vermehrt worden waren. Die Eier wurden am 11. Bebrütungstag beimpft, die Eihäute wurden am 16. Bebrütungstag geerntet. Die Membranen wurden dann gefroren und unter Vakuum im Exsiccator über Phosphorpentoxyd getrocknet. Die getrockneten Membranen wurden zerrieben, gewogen, gesiebt und in Ampullen verbracht, die nach der Evakuierung verschlossen wurden.

Die Versuche ergaben, daß ein H-Virus, das 21 Jahre bei +4-5° C im Vakuum aufbewahrt worden war, Hühner noch gegen eine Testinfektion zu schutzen vermochte. Ebenso immunisierte ein unter den gleichen Bedingungen aufbewahrtes T-Virus die Hühner noch nach 20 Jahren, so daß die testinfizierten Impflinge nicht erkrankten.

H- und T-virushaltiges Material, das 22 bis 28 Jahre in nicht

evakuierten Ampullen gelagert hatte, erwies sich als inaktiviert.

Für die in Deutschland im Handel erhältlichen Hühnerpocken-Impfstoffe sind in den Prospekten und Impfanweisungen verschiedene Haltbarkeitsfristen angegeben.

Die Firma "NOBILIS" (25) beispielsweise gewinnt den Ei-Impfstoff über die CAM 12 Tage lang bebrüteter Hühnereier. Nach der Beimpfung mit einer Suspension von T-Virus werden die Eier 3 Tage bebrütet. Die Eihäute werden dann geerntet, im Vakuum getrocknet und gemahlen. Das Pulver wird in Ampullen gefüllt und in diesen sauerstoff-frei eingeschmolzen. Ein gepuffertes Lösungsmittel dient zur Resuspension des Trockenimpfstoffes.

Wenn der Impfstoff kühl (Keller, Eisschrank) und dunkel aufbewahrt wird, soll er seine immunogene Wirksamkeit 2 Jahre lang behalten.

Die BEHRINGWERKE (5) gewinnen das T-Virus für ihren Impfstoff ebenfalls von embryonierten Hühnereiern. Das virushaltige Eihautgewebematerial wird lyophil getrocknet und in evakuierten Fläschchen in den Handel gebracht. Die Haltbarkeitszeit ist mit mehreren Monaten angegeben.

Das Bakteriologische Institut von Dr. RENTSCHLER & Co. (1) stellt einen Gewebskulturimpfstoff her, der mittels T-Virus-Dauerpassagen in Hühnerembryo-Fibroblasten-Zellkulturen gewonnen wird. Das virushaltige Material wird lyophil getrock-

net und in evakuierten Ampullen mit beigefügtem Lösungsmittel abgegeben. Der Virustiter des Impfstoffes beträgt mindestens 10^{-5} bei der Titrierung in Gewebekultur.

Nach Mitteilung der Firma hält sich das T-Virus bei einer Temperatur von -20° C nicht unbegrenzt. Doch rechnet man damit, daß der Gewebe-Impfstoff bei einer Aufbewahrung bei -20° C während eines Jahres keinen nennenswerten Titerverlust erleidet. Bei Aufbewahrung bei+4-6° C wird ein Absinken des Titers erwartet, ebenso sind Titerverluste nach Aufbewahrung bei Zimmertemperatur über eine längere Zeit unvermeidbar. Dagegen soll eine mehrtägige Lagerung bei Zimmertemperatur nicht unbedingt einen Wirksamkeitsverlust herbeiführen.

Das Impfstoffwerk FRIESOYTHE (20) stellt einen flüssigen Impfstoff und einen Trockenimpfstoff aus T-Virus gleichfalls aus vorbebrüteten Hühnereiern her. Der flüssige Impfstoff ist gebrauchsfertig und soll bei+4° C gelagert eine Haltbarkeitsfrist von 6 Wochen haben. Der Trockenimpfstoff ist lyophil getrocknet, er wird in evakuierten Ampullen abgegeben. Bei Aufbewahrung bei+4° C soll er seine immunogenen Eigenschaften 1 Jahr lang behalten.

Der Impfstoff "Nodiphtherit" der VETERINÄR CHEMIE (33) stellt ein T-Virus dar, das über die Brusthaut der lebenden Taube gewonnen wird. Das virushaltige Hautpockenmaterial wird über einem hygroskopischen Chemikal im Vakuum getrocknet und in Ampullen verbracht, die nach der Evakuierung zugeschmolzen werden. Bei kühler und trockener Lagerung soll der Impfstoff 12 Monate aufbewahrt werden können, ohne daß ein Wirksamkeits-

verlust eintritt.

Ueber den Hühnerpockenimpfstoff auf T-Virusbasis "Neo-Avisan-T" der Impfstoffwerke DESSAU sind Angaben von OTTA (26) gemacht worden.

Bei der Herstellung des Ei-Impfstoffes werden 11 Tage bebrütete Hühnereier, die nur aus Hühnerbeständen stammen, die weder mit Pullorum-Infektion noch Marekscher Lähme verseucht sind, durch die Luftkammer mit dem T-Virus beimpft. Zur Impfstoffbereitung werden nur Eier verwendet, deren Embryonen frühestens 120 Stunden p.i. abgestorben sind oder noch leben. Die zu verarbeitenden Eihäute müssen mit deutlichen Pockenherden behaftet sein. Die geernteten Eihäute werden nach der Homogenisierung in Ampullen gefüllt und lyophilisiert. Die Ampullen werden evakuiert und zugeschmolzen. Dem Homogenisat jeder Ampulle wird vor dem Lyophilisieren 225 E Penicillin und 120 γ Streptomycin zugesetzt. Vor dem Gebrauch wird die Trockenmasse in einer Glyzerin-Phosphatasepuffer-Lösung resuspendiert. Bei kühler und dunkler Aufbewahrung soll der Impfstoff 1 Jahr lang seine immunogene Wirksamkeit behalten.

Eigene Untersuchungen

Bei den Untersuchungen kam es darauf an, zwei auf verschiedene Weise getrocknete Impfstoffe nach Lagerung in bestimmten Intervallen auf ihre immunogene Wirksamkeit zu prüfen. Dazu war erforderlich, daß beide Impfstoffe aus gleichem Ausgangsmaterial hergestellt, aber auf verschiedene Weise getrocknet wurden. Die Impfstoffe wurden in 1 ml Ampullen gefüllt, die vor dem Zuschmelzen evakuiert worden waren. Die Ampullen wurden im Eisschrank bei +4° C unter Vermeidung von Tageslichteinfall aufbewahrt.

Eine Testung auf die immunogene Wirksamkeit der Impfstoffe war alle 2 Monate vorgesehen, sie sollte am Huhn mittels intrafollikulärer Injektion erfolgen.

Um die Zahl der für die Testung erforderlichen Junghühner nicht zu groß werden zu lassen, wurden die Testungen bei jedem Impfstoff in der Verdünnung 1:50 durchgeführt. Diese Verdünnungsstufe wurde deshalb gewählt, weil sie aufgrund früherer Arbeiten (16) bei wirksamen Hühnerpockenimpfstoffen auf T-Virusgrundlage mindestens ein 50 %iges Angehen der beimpften Federfollikel bewirkte.

Nach Ablauf einer etwa 12 monatigen Lagerungszeit sollten schließlich die Impfstoffe noch einer Testung auf ihre Ei-ID 50 unterworfen werden.

I. Material

Für die Untersuchungen diente ein über die Taube vermehrter T-Virusstamm eines Handelsimpfstoffes, der in trockener Form vorlag und dessen Wirksamkeitsfrist noch nicht abgelaufen war. Nach Angaben der Hersteller stellte dieser Stamm eine Selektion von gut immunisierenden T-Virusstämmen dar.

Für die Vermehrung des Virus waren 22 Tauben, für die Testungen der Impfstoffe 150 Hühner, in einem Alter von 3-5 Monaten vorgesehen. Tauben und Hühner waren in gutem Nährzustand und frei von Krankheiten. Entweder wurden die Hühner bei Versuchsbeginn in Käfigbatterien gesetzt oder im Auslauf belassen.

Die Ei-ID 50-Bestimmung erforderte 80 Bruteier. Die Eier wurden von einem institutseigenen Hühnerbestand, der klinisch gesund war und einer Pest- und Pocken-Diphteroid-Schutzimpfung unterworfen worden war, gewonnen. Nur mittelgroße Eier ohne Schalenfehler wurden verwendet.

II. Technik

1. Impfstoffherstellung

An der Brust wurde den Tauben in einer Fläche von ungefähr 5 x 10 cm die Federn durch Ausrupfen entfernt, so daß die Federfollikel deutlich zu sehen waren. Der in seinem Lösungsmittel in der vorgeschriebenen Verdünnung suspendierte Handelsimpfstoff wurde mit einem Pinsel auf diese Fläche

aufgetragen und leicht in die Follikel eingerieben. Nachdem sich am 10.Tage p.i. Pockeneruptionen des Stadiums pustulosum und crustosum entwickelt hatten, erfolgte die Tötung, um die mit Pockeneruptionen behafteten Hautflächen zu gewinnen. Letztere wurden dann bei -20° C im Tiefkühler bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt. Leber, Milz und Nieren jeder Taube wurden kulturell untersucht (Drigalski- und Gassner-Platte).

Zur Impfstoffherstellung wurden ausschließlich Taubenhäute verwendet, an denen stark ausgebreitete Pockeneruptionen entstanden waren.
Eine Menge von 40 Gramm der mit Pocken behafteten Taubenhaut wurde mit einer Schere mäßig zerkleinert und je 10 Gramm mit 17 ml einer sterilisierten Magermilch versetzt. 5 bis 6 ml der Taubenhaut-Milchsuspension wurden nacheinander mit dem Homogenisator (Type E.Bühler/Tübingen/Max. 35 000 U/Min.) homogenisiert, wobei eine Wärmeentwicklung durch Kühlung mit Leitungswasser und kurzfristige Unterbrechungen des Vorganges vermieden wurde.
Nach Filtration durch grobmaschige, sterile Mull-Gaze zur Entfernung kleiner Gewebsfetzen wurden der homogenen Suspension 4 ml einer Lösung von 200 000 E Penicillin / 200 mg Dihydrostreptomycinsulfat zugesetzt.
Insgesamt lagen schließlich 64 ml der Impfstoffsuspension vor, die in Ampullen zu je 1 ml abgefüllt wurden. 32 Ampullen wurden während 6 Stunden lege artis lyophil getrocknet und nach Evakuierung im Vakuum abgeschmolzen (Impfstoff LY).

Die anderen 32 Ampullen wurden, da sie an der Luft austrocknen sollten, 48 Stunden der Brutschrankwärme bei 37° C ausgesetzt. Diese Art der Trocknung erwies sich als unzureichend, so daß noch eine Nachtrocknung im evakuierten Exsiccator während 3 Stunden über einem hygroskopischen Chemikal (Calcium chloratum crudum) vorgenommen wurde (Impfstoff TR 1).
Auch diese Ampullen wurden dann evakuiert und abgeschmolzen.

Nach diesen Arbeitsgängen lagen uns aus gleichem Material und nach gleichem Herstellungsverfahren ein lyophilisierter Impfstoff (LY) und ein Trockenimpfstoff (TR 1) vor, letzterer war bei der Eintrocknung 48 Stunden der Brutschrankwärme von 37° C ausgesetzt worden.

Aus 20 Gramm mit Pockeneruptionen behafteter Taubenhaut wurde nach gleicher Technik ein weiterer Impfstoff (TR 2) hergestellt. Er wurde nach dem Homogenisieren lediglich im evakuierten Exsiccator mittels Calcium chloratum getrocknet. Es unterblieb die 48 stündige Brutschranktrocknung bei 37° C.

2. Impftechnik

Die intrafollikuläre Impfmethode wurde, wie sie von HARTWIGK und KRASSELT (17) beschrieben wurde, vorgenommen.
An der lateralen Fläche des Unterschenkels erfolgte zunächst ein Stutzen der Federn mit der Schere bis die Schäfte noch in einer Länge von etwa 1 cm aus den Federfollikeln herausragten. Dann wurden bei jedem Huhn 10 Federkiele mit

einer Pinzette erfaßt und aus ihren Follikeln entfernt, um den entfiederten Follikel mit 0,05 bis 0,07 ml des 1:50 verdünnten Impfstoffes mit einer 1 ml Injektionsspritze und aufgesetzter, kurz angeschliffener Kanule zu beschicken. Da die Zahl der angegangenen Impfpocken in direktem Verhältnis zum immunogenen Effekt steht (16) und (18), war zu erwarten, daß mit dieser Testmethode die Wirksamkeit der Impfstoffe festgestellt werden konnte.

3. Titration der Impfstoffe an der CAM des bebrüteten Hühnereies

Die Eier wurden 10 Tage lang bebrütet. Mit der Korund-Scheibe eines Zahnbohrers wurde in ihre Kalkschale eine Oeffnung in Form eines gleichseitigen Dreiecks von einer Seitenlänge von 5 bis 6 mm geschnitten. Mit einer spitzen Schere wurde dann die Schalenhaut mit einer zirka stecknadelkopfgroßen Oeffnung versehen. Dann konnte die CAM mit 0,1 ml einer Impfstoffverdünnung aus einer 1 ml Injektionsspritze mit langer Kanüle beimpft werden.
Nach Verschluß der dreieckigen Oeffnung der Kalkschale mit "Tesafilm" wurden die Eier weitere 7 Tage bebrütet.
Zwecks Abtotung der Embryonen wurden die Eier am 8.Tag p.i. im Eisschrank bei +4° C gelagert.
Am 9. Tag p.i. wurden die Eier geöffnet, die Eihäute entnommen und auf entstandene Pockenherde untersucht. Traten diese nicht nur an der Animpfstelle, sondern auch entfernt von ihr auf, so wurde das als Zeichen einer erfolgten Infektion der CAM gewertet. In den Verdünnungsstufen 1:1000,

1:2000, 1:5000, 1:8000 und 1:10 000 wurden die Impfstoffe auf die Eimembranen überimpft, wobei für jede Verdünnungsstufe 8 Eier vorgesehen waren.
Die Berechnung der Ei-ID 50 erfolgte nach REED und MUENCH (28).

III. Ergebnisse

1. Testung am Huhn

A. Der lyophilisierte Impfstoff (LY)

Dem lyophilisierten Impfstoff lag die gleiche Menge eines nach gleichen Grundsätzen gewonnenen Ausgangsmaterials der beiden unter B. und C. aufgeführten Trockenimpfstoffe zugrunde.
Die Ergebnisse der Prüfung mittels der intrafollikulären Impfung am Huhn sind in der Tabelle A nachstehend zusammengefaßt.
Insgesamt erfolgten 8 Testungen nach verschiedenen Aufbewahrungszeiten. (s.Spalte 2)
Der Impfstoff wurde als lyophilisierter Trockenimpfstoff den einzelnen unter Vakuum verschlossenen Ampullen entnommen. Der Inhalt einer Ampulle, ier 98 bis 100 mg wog, wurde in 3 ml einer einfachen physiologischen Kochsalzlösung resuspendiert. Die Suspension wurde dann mit der physiologischen Kochsalzlösung im Verhältnis 1:50 verdünnt.
Die für die Testungen vorgesehene Tierzahl betrug je Impfstoffverdünnung 7 bis 10 Tiere. Bei der sechsten bis ach-

Testung des lyophilisierten Impfstoffes

	1. Datum d. Testung	2. Aufbewahrungszeit	3. Verdünnung	4. Tierzahl	5. Zahl d. beimpf. Follik.	6. Zahl d. angegangenen Impfpocken	7. Ausbildungsgrad d. Impfpocken	8. Prozent d. angegangenen Impfpocken
1. Testung	13.1.60	5 Tage	1:50	7	70	69	XXX	98,4 %
2. "	7.3.60	60 Tage	1:50	10	100	92	XXX	92 %
3. "	13.5.60	127 Tage	1:50	10	100	99	XXX	99 %
4. "	12.7.60	187 Tage	1:50	10	100	98	XXX	98 %
5. "	15.9.60	251 Tage	1:50	10	100	97	XXX	97 %
6. "	3.11.60	304 Tage	1:50	16	160	126	XX/XXX	79 %
7. "	15.3.61	436 Tage	1:50	12	120	10	X	8,4 %
8. "	29.3.61	450 Tage	1: 1	12	120	30	X	25 %

Tabelle B

Testung des Trockenimpfstoffes (TR 1), der bei der Herstellung im Brutschrank getrocknet worden war.

	1. Datum d. Testung	2. Aufbewahrungszeit	3. Verdünnung	4. Tierzahl	5. Zahl d. beimpf. Follik.	6. Zahl d. angegangenen Impfpocken	7. Ausbildungsgrad d. Impf - pocken	8. Prozent d. angegangenen Impfpocken
1. Testung	13.1.60	5 Tage	1:50	7	70	44	XX/XXX	62,5 %
2. Testung	7.3.60	60 Tage	1:50	10	100	79	XX/XXX	79 %
3. Testung	13.5.60	127 Tage	1:50	10	100	22	XX	22 %
4. Testung	12.7.60	187 Tage	1:50	10	100	27	X/XX	27 %
5. Testung	3.11.60	304 Tage	1:50	16	160	13	X	8 %

ten Testung wurde die Tierzahl auf 16 bzw. 12 erhöht.
Da der Wirksamkeitsgrad des Impfstoffes bei der siebenten Testung erheblich abgesunken war, wurde derselbe 14 Tage später an die gleichen Tiere am anderen Unterschenkel noch einmal, jedoch als unverdünnte Suspension verimpft.
Dies geschah um festzustellen, ob der Impfstoff in der vorliegenden Form noch eine gewisse Wirksamkeit besaß. Die Verdünnungen sind in Spalte 3, die Tierzahlen in Spalte 4 angegeben. Die Zahl der bei jeder Testung beimpften Federfollikel ist aus Spalte 5 zu ersehen.
Die Zahl der angegangenen Impfpocken ist in der Spalte 6 aufgeführt. Die Impfpocken sind stets am 8. Tag p.v. abgelesen worden.
Dabei wurde nach folgendem Schema beurteilt:

Erbsengroße Impfpocken	=	XXX
Weizenkorngroße Impfpocken	=	XX
Doppelstecknadelkopfgroße Impfpocken	=	X

Soweit die Größe der Impfpocken sich nicht in dieses Schema einordnen ließ, wurden die Zwischenstufen gewählt, wie beispielsweise XX/XXX.

In der letzten und 8. Spalte der Tabelle sind schließlich die Prozentsätze der angegangenen Impfpocken erwähnt, sie beziehen sich auf die Gesamtzahl der beimpften Federfollikel als Hundertsatz.

Aus der Tabelle A ist zu ersehen, daß der Impfstoff am 3.11.1960 -nach 304 Tagen Aufbewahrung- bei seiner sechsten

Testung einen deutlichen Wirksamkeitsabfall von zirka 20 % auf 79 % zeigte. Dieser Abfall hat sich in der folgenden Zeit verstärkt, denn bei der siebenten Testung am 15.3.61 - nach einer Aufbewahrungszeit von 436 Tagen - waren bei 12 Tieren von 120 beimpften Follikeln nur 10 (= 8,4 %) Impfpocken angegangen. Als die gleichen Tiere 14 Tage später mit einer unverdünnten Suspension des lyophilisierten Impfstoffes aus einer anderen Ampulle am anderen Unterschenkel nachgeimpft wurden, gingen von 120 beimpften Follikeln 30 Impfpocken an (= 25 %). Dies Ergebnis ließ darauf schließen, daß der lyophilisierte Impfstoff bei einer Lagerung von insgesamt 450 Tagen erheblich an Wirksamkeit eingebüßt hatte.

Der Ausbildungsgrad der Impfpocken, der zwar nach dem Schrifttum für die Stärke der sich ausbildenden Immunität nicht maßgebend sein soll, war bereits bei der sechsten Testung - nach 304 Tagen - am 3.11.1960 erheblich vermindert, denn die Impfpocken erreichten nicht mehr in jedem Fall die Größe, die sie bei den vorangegangenen Testungen aufgewiesen hatten. Bei der siebenten und achten Testung wurden die entstandenen Impfpocken nur noch mit X bewertet.

B. Der Trockenimpfstoff (TR 1)

Menge und Art des Ausgangsmaterials waren die gleichen wie bei dem lyophilisierten Impfstoff. Auch gestalteten sich die Arbeitsgänge bis zur Eintrocknung völlig gleichartig. Die homogenisierte und in Ampullen gefüllte Impfstoffsuspension wurde 48 Stunden in den Brutschrank bei 37° C gebracht.

Anschließend wurde er während 3 Stunden im evakuierten Exsiccator über einem hygroskopischen Chemikal getrocknet.
Die Ampullen wurden dann evakuiert und zugeschmolzen. Es wurden fünf Testungen am Huhn nach verschiedenen Aufbewahrungszeiten vorgenommen. Die Impfmethode, das Suspendieren und Verdünnen wurde genau wie bei dem lyophilisierten Impfstoff gehandhabt.
Für die erste bis vierte Testung wurden je 7 bis 10 Tiere verwendet, für die letzte 16. Die Ergebnisse sind in der Tabelle B zusammengestellt.
Bei dem Impfstoff TR 1 gingen bereits bei der ersten Testung am 13.1.1960 - nach einer 5 tägigen Aufbewahrungszeit - die Impfpocken nur zu 62,5 % an. Bei der dritten Testung am 13.5.60 - nach einer Aufbewahrungszeit von 127 Tagen - konnten nur noch bei 22 % der beimpften Federfollikel Impfpocken festgestellt werden. Ihr Ausbildungsgrad wurde mit XX bewertet.
Nach 187 Tagen wurden bei der vierten Testung 27 % Impfpocken mit dem Ausbildungsgrad X/XX ermittelt.
Bei der fünften Testung - nach 304 Tagen Aufbewahrung - war der TR 1 nur noch zu 8 % wirksam. Die Impfpocken waren ausgesprochen schwach (X) ausgebildet.

Die geringe Wirksamkeit des TR 1 war damit zu erklären, daß die in Ampullen befindliche homogenisierte Impfstoffsuspension 48 Stunden bei +37° C aufbewahrt worden war. Im Schrifttum ist mehrfach darauf hingewiesen, daß das T-Virus bei +37° C erheblich an Aktivität verliert (7, 13, 23, 35). In einem besonderen Versuch an 5 Junghühnern konnte diese Tatsache bestätigt werden. Es wurde dabei eine 1:50 verdünnte Suspension

des lyophilisierten Impfstoffes, die eine hohe impfpockenerzeugende Wirksamkeit besaß, 48 Stunden lang bei 37° C im Brutschrank aufbewahrt und anschließend intrafollikulär an Junghühner verimpft. Der Impfstoff bewirkte dann nur zu 16 % ein Angehen der Impfpocken, hingegen zeigte eine gleiche Impfstoffverdünnung, die nicht 48 Stunden bei 37° C gehalten worden war, bei Verimpfung an 12 Junghühner ein Angehen der Impfpocken zu 97 .

C. Der Trockenimpfstoff (TR 2)

Gewinnung des Ausgangsmaterials und seine Verarbeitung glichen in allen Einzelheiten denen des TR 1. Die Trocknung wurde allerdings ausschließlich im Vakuum vorgenommen, die Aufbewahrung bei 37° C wurde vermieden. Der Impfstoff wurde resuspendiert und verdünnt, wie es bei dem lyophilisierten Impfstoff beschrieben worden ist. Es erfolgten sechs Testungen nach verschiedenen Aufbewahrungszeiten. Zu jeder Testung standen 9 bis 10 Hühner zur Verfügung. Die Zahlen und Ergebnisse sind in der Tabelle C dargestellt. Sie stützen sich auf die gleichen Stichtage und Errechnungen wie bei den beiden anderen Impfstoffen. Nach Tabelle C erwies sich der im Vakuum getrocknete Impfstoff von der ersten bis zur vierten Testung - nach einer Aufbewahrungszeit von 202 Tagen - als gleich gut wirksam. Der Impfstoff rief in dieser Zeit 95 bis 99 % Impfpocken an den beimpften Federfollikeln hervor. Der Ausbildungsgrad der Impfpocken entsprach der Bewertung XXX. Nach einer Aufbewahrung von 1 Jahr hatte der TR 2 bei der fünften Testung einen Wirksamkeitsabfall um 20 % auf 76% erlitten, die Impfpocken zeigten einen Ausbildungsgrad von XX.

Tabelle C

Testung des Trockenimpfstoffes (TR 2), der nicht im Brutschrank getrocknet worden war.

	1. Datum d. Testung	2. Aufbewahrungszeit	3. Verdünnung	4. Tierzahl	5. Zahl d. beimpf. Follik.	6. Zahl d. angegangenen Impfpocken	7. Ausbildungsgrad d. Impfpocken	8. Prozent d. angegangenen Impfpocken
1. Testung	7.3.60	11 Tage	1:50	10	100	95	XXX	95 %
2. Testung	13.5.60	78 Tage	1:50	10	100	99	XXX	99 %
3. Testung	12.7.60	138 Tage	1:50	10	100	99	XXX	99 %
4. Testung	15.9.60	202 Tage	1:50	10	100	99	XXX	99 %
5. Testung	17.2.61	357 Tage	1:50	9	90	69	XX	76 %
6. Testung	5.8.61	526 Tage	1:50	10	100	15	X	15 %

Bei der sechsten Testung am 5.8.1961 - nach einer Aufbewahrungszeit von 526 Tagen - gingen nur noch 15 der beimpften Federfollikel als Impfpocken an, die nur noch mit X bewertet werden konnten.

2. Testung am bebrüteten Hühnerei

Nach einer 12 bzw. 11 monatigen Lagerung bei +4° C im Eisschrank wurde mit dem lyophilisierten Impfstoff LY und mit dem Trokkenimpfstoff TR 2, der bei seiner Herstellung nur im evakuierten Exsiccator getrocknet worden war, eine Ei-ID 50-Bestimmung auf der CAM des 11 Tage bebrüteten Hühnereies vorgenommen. Bei beiden Impfstoffen wurden in jeder Verdünnungsstufe die Eihäute von 8 Eiern mit 0,1 ml verdünntem Impfstoff beschickt.

Die Ergebnisse der Testung sind für den lyophilisierten Impfstoff in der Tabelle E und für den Impfstoff TR 2 in der Tabelle F niedergelegt. In der Spalte 1 der Tabellen sind die einzelnen Verdünnungsstufen eingetragen, in den Spalten 2 und 3 die Zahlen der Eier, auf deren Eihäuten sich 7 Tage p.i. Pockenherde ausgebildet bzw. sich zu diesem Zeitpunkt solche nicht ausgebildet hatten.
Aufgrund der Berechnung von REED und MUENCH (28) entstehen die Spalten 5 und 6. Durch fortlaufende Addition der Eier in der Spalte 2, von der höchsten Verdünnungsstufe beginnend (1:10000), erhält man die Ergebnisse der Spalte 4, ebenso durch Addition der Eier aus Spalte 3, von der niedrigsten Verdünnungsstufe beginnend (1:1000), die der Spalte 5. Die Ergebnisse in Pro-

T a b e l l e E

ie Ei-ID 50-Bestimmung bei dem lyophilisierten Impfstoff (nach Reed und Muench)

1. rdünnungs-stufen	2. Zahl d.Eier mit Pocken-herden auf den CAM	3. Zahl d.Eier ohne Pocken-herde auf den CAM	4. Addition d. Spalte 2 bei 1:10000 beginnend	5. Addition d. Spalte 3 bei 1:1000 beginnend	6. Prozentsätze d.Eier mit Pockenherden auf den CAM
1: 1000	5 Eier	3 Eier	17	3	17 sind 85 %
1: 2000	4 "	4 "	12	7	12 " 66,5 %
1: 5000	3 "	5 "	8	12	8 " 40 %
1: 8000	4 "	4 "	5	16	5 " 23,5 %
1:10000	1 Ei	7 "	1	23	1 ist 4,1%

e Ei-ID 50 liegt zwischen den Verdünnungen 1:2000(66,5%)u.1:5000(40%) bei 1:4158 (50 %) d.h. bei $10^{-3,619}$.

T a b e l l e F

ie Ei-ID 50-Bestimmung bei dem Trockenimpfstoff TR 2(nach Reed u.Muench)

1. rdünnungs-stufen	2. Zahl d.Eier mit Pocken-herden auf den CAM	3. Zahl d.Eier ohne Pocken-herde auf den CAM	4. Addition d. Spalte 2 bei 1:10000 beginnend	5. Addition d. Spalte 3 bei 1:1000 beginnend	6. Prozentsätze d.Eier mit Pockenherden auf den CAM
1: 1000	8 Eier	kein Ei	26	0	26 sind 100%
1: 2000	7 Eier	1 Ei	18	1	18 " 93,6%
1: 5000	5 Eier	3 Eier	11	4	11 " 72,6%
1: 8000	4 Eier	4 Eier	6	8	6 " 42,6 %
1:10000	2 Eier	6 Eier	2	14	2 " 12,4%

e Ei-ID 50 liegt zwischen den Verdünnungen 1:5000(72,6%)u.1:8000(42,6%) bei 1:5667 (50 %) d.h. bei $10^{-3,753}$.

zentsätze sind schließlich in Spalte 6 eingetragen.

Bei dem lyophilisierten Impfstoff LY liegt die Ei-ID 50 zwischen den Verdünnungen 1:2000 (66,5 %) und 1:5000 (40 %), während sich der 50 %-Wert bei dem Trockenimpfstoff TR 2 zwischen den Verdünnungen 1:5000 (72,6 %) und 1:8000 (42,6 %) befindet.

Bei der Berechnung ergibt sich, daß die Ei-ID 50 bei dem lyophilisierten Impfstoff LY bei der Verdünnung von 1:4158 ($10^{-3,619}$) und bei dem Trockenimpfstoff TR 2 bei der Verdünnung von 1:5667 ($10^{-3,753}$) liegt.

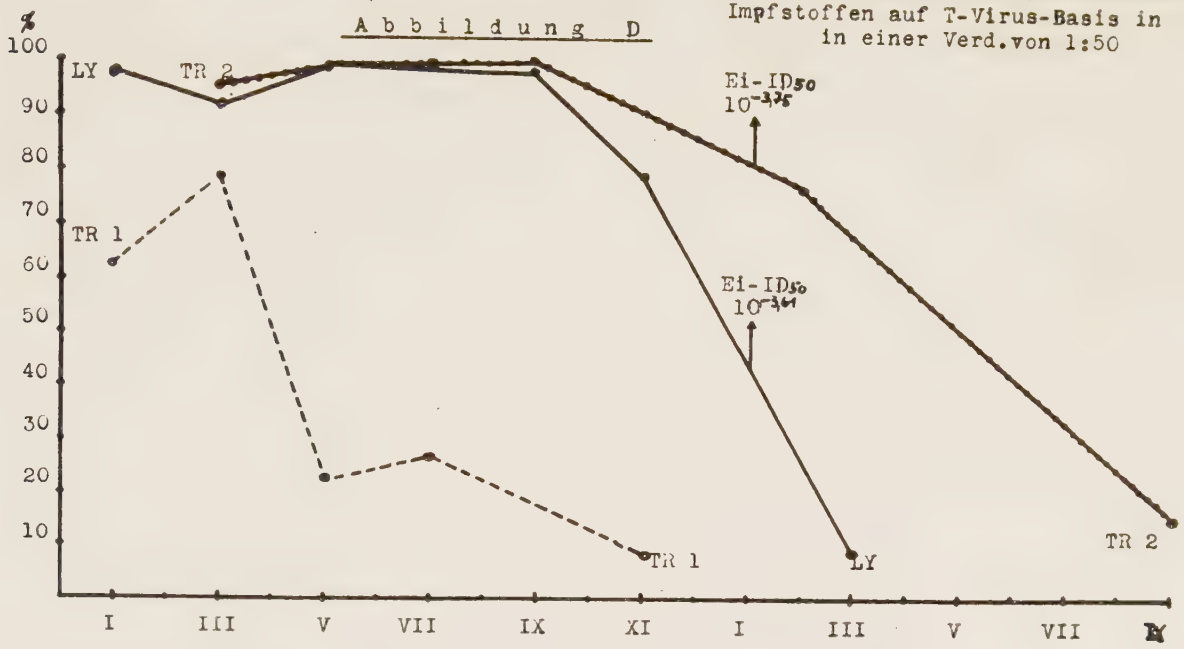
Besprechung

Aus einem homogenisierten Taubenpocken-Brusthautmaterial wurden drei Impfstoffe hergestellt, die auf verschiedene Weise getrocknet wurden. Der erste Impfstoff (LY) wurde lyophil getrocknet und in evakuierten Ampullen bei +4° C aufbewahrt.
Der zweite Impfstoff (TR 1) wurde zunächst im Brutschrank bei 37° C 2 Tage lang vorgetrocknet, um ihn dann über Calcium chloratum im evakuierten Exsiccator völlig zu trocknen.
Die Trockenmasse wurde auch in evakuierten Ampullen bei +4° C im Eisschrank aufbewahrt.
Bei dem dritten Impfstoff (TR 2) unterblieb die Trocknung im Brutschrank, sonst wurde wie bei dem Impfstoff TR 1 verfahren.

Die Ergebnisse der etwa alle 2 Monate erfolgenden Prüfungen auf impfpockenerzeugende Wirksamkeit mit der intrafollikulären Injektion der 1:50 verdünnten Impfstoffe sind in nachstehenden 3 Kurven graphisch dargestellt, wobei auf der Ordinate die Prozentsätze der angegangenen Impfpocken, berechnet auf die Zahl der an den Tierkollektiven beimpften Federfollikel, auf der Abszisse die einzelnen Monate, in denen die Prüfungen erfolgten, eingetragen wurden.

Ergebnisse der intrafollikulären Testung von 3 auf verschiedene Weisen getrockneten Impfstoffen auf T-Virus-Basis in in einer Verd.von 1:50

Abbildung D



LY Kurve des lyophilisierten Impfstoffes (LY)
TR 1 Kurve des im Brutschrank u.im Vakuum getrockneten Impfstoffes (TR 1)
TR 2 Kurve des nur im Vakuum getrockneten Impfstoffes (TR 2)

Die Kurven der Impfstoffe LY und TR 2 sind in ihrem Verlauf ähnlich. Bei beiden Impfstoffen kam es nach 7 bzw. 8-monatiger Lagerung zu einem Wirksamkeitsabfall, der bei dem Impfstoff LY anscheinend etwas schneller als bei dem im evakuierten Exsiccator getrockneten Impfstoff TR 2 erfolgte. Allerdings wurden beide Impfstoffe nicht in gleichen Intervallen getestet. Im Januar 1961, als der LY 12 Monate und der TR 2 11 Monate gelagert hatten, ergaben Titrationen auf der CAM des embryonierten Hühnereies bei dem Impfstoff LY eine niedrigere Ei-ID 50 ($10^{-3,6}$) als bei dem Impfstoff TR 2 (Ei-ID 50 von $10^{-3,5}$), so daß wohl geschlossen werden kann, daß der Wirksamkeitsabfall nach dem 8. Monat bei dem Impfstoff TR 2 nicht so jäh erfolgte wie bei dem Impfstoff LY. Die impfpockenerzeugende Wirksamkeit hatte sich bei beiden Impfstoffen im 10. bzw. 12. Monat ihrer Aufbewahrung um 20 % vermindert. Nach 14-monatiger Lagerung sank die Wirksamkeit des Impfstoffes LY auf 8,4 % ab, während der Impfstoff TR 2 am Ende des 17. Monats seiner Aufbewahrung noch bei 15 % der beimpften Follikel Impfpocken hervorrief.

Nach unserer Auffassung läßt sich aus den Ergebnissen schließen, daß beide Impfstoffe ihre ursprüngliche Wirksamkeit 7 bis 8 Monate lang behielten, und eine gleich lange Haltbarkeit gehabt haben dürften. Die Lyophilisation war also der einfachen Trocknung im evakuierten Exsiccator über einem hygroskopischen Chemikal nicht überlegen. Ob diese Feststellung für jeden lyophilisierten Impfstoff gilt, muß dahin gestellt bleiben, da bei Verwendung anderer Virus-

stämme und anderer Stabilisatoren die Möglichkeit besteht, daß andere Ergebnisse erzielt werden.

TSUBAHARA und Mitarbeiter (32) stellten fest, daß ihr lyophilisierter T-Impfstoff eine anfängliche Ei-ID 50 von 10^{-5} erst nach 12 Monate langer Aufbewahrung bei +2-5° C einbüßte. Der Virustiter war zu diesem Zeitpunkt auf 10^{-3} gesunken, ein Ergebnis, das meinen Untersuchungsergebnissen fast entspricht. Eine Minderung der impfpockenerzeugenden Wirksamkeit konnten die Autoren nicht beobachten, was aber nicht unbedingt im Widerspruch zu meinen Ergebnissen zu stehen braucht, weil die Autoren die Auswertung am Huhn nach anderen Grundsätzen als ich vornahmen.

Da die Applikationstechnik nicht beschrieben wurde, liegt die Vermutung nahe, daß die Autoren den unverdünnten Impfstoff auf eine entfiederte Hautfläche am Unterschenkel brachten, ohne eine Beimpfung bestimmter Zahlen von Federfollikeln vorzunehmen. Aus anderen Versuchen ist uns bekannt (22), daß Hühnerpockenimpfstoffe aus originärem T-Virus mit einer Ei-ID 50 von 10^{-3} in unverdünntem Zustand durchaus noch an fast allen mit dem Impfstoff in Kontakt gebrachten Federfollikeln Impfpocken erzeugen können.

In Uebereinstimmung zu den erzielten Ergebnissen steht, daß von den meisten Herstellern für Hühnerpockenimpfstoffe aus originärem T-Virus Haltbarkeitsfristen angegeben werden, die sich mit den ermittelten Fristen fast decken.

So sind für den lyophilisierten Gewebskulturimpfstoff des Bakteriologischen Instituts von Dr. RENTSCHLER & Co. (1), den

lyophilisierten Ei-Impfstoff des Impfstoffwerkes FRIESOYTHE (20), den lyophilisierten Ei-Impfstoff der Impfstoffwerke DESSAU (26) und vor allem auch für den von der lebenden Taube gewonnenen Trockenimpfstoff der VETERINAER CHEMIE (33) bei Aufbewahrung im Eisschrank Haltbarkeitsfristen von 1 Jahr zugrunde gelegt.

RICHTERS Mitteilung (30), daß sein lyophilisierter T-Impfstoff bei Aufbewahrung bei Zimmertemperatur eine Haltbarkeit von 3 Jahren besitzt, möchten wir als einen Beweis dafür ansehen, daß es dem Autor gelungen ist, das Virus durch schonende Behandlung und Art der Konservierung in seiner Aktivität längere Zeit zu erhalten, als das bei unserem Impfstoff der Fall war. Daß die theoretische Möglichkeit dazu besteht, kann aus übereinstimmenden Berichten über die hohe Penazität des T-Virus (BURNET (7), VAN HOELSBERGEN (19), BEAUDETTE (3) u. (4), BRYAN (6) und GOLDHAFT (12)) entnommen werden.

Diesen Berichten stehen allerdings auch wieder Aussagen gegenüber, die nur von einer geringen Haltbarkeit der Impfstoffe sprechen. VAN ZWOL (35) wies beispielsweise nach, daß im Eisschrank und im Vakuum aufbewahrtes T-virushaltiges Trockenmaterial bereits nach einer 4-monatigen Lagerung einen beträchtlichen Virustiterverlust erlitten hatte.

Anderseits konnte GOLDHAFT (12) in neuester Zeit feststellen, daß eine lyophilisierte Hühnerpockenvakzine, die im Vakuum bei + 4-5° C gelagert hatte, Hühner noch nach 21 Jahren ausreichend immunisierte, so daß die Impflinge eine Testinfektion mit virulentem H-Virus 28 Tage p.v. überstanden.

Ebenso war ein Impfstoff aus originärem T-Virus nach 20 jähriger Aufbewahrung in seiner immunogenen Wirksamkeit noch nicht gemindert. Diese Versuchsergebnisse sind in keiner Weise mit meinen in Einklang zu bringen und mir unverständlich, weil abgesehen von der Aufbewahrung im Vakuum, nichts unternommen worden war, um das Virus in seiner Aktivität zu erhalten. Auch entspricht die von GOLDHAFT angewandte Technik der Prüfung nicht den Grundsätzen, die wir heute als richtig erkannt haben. Ueber den Virusgehalt der so lange aufbewahrten Impfstoffe wurde nichts bekanntgegeben, weil offenbar eine Testung auf der CAM des embryonierten Hühnereies unterblieben ist.

Der dritte Impfstoff TK 1, der 2 Tage lang nach dem Homogenisieren des pockenhaltigen Brusthautmaterials bei 37° C im Brutschrank getrocknet worden war, hatte schon nach seiner Herstellung eine geringe impfpockenerzeugende Wirksamkeit, rief er doch nur an 62,5 % der mit der Impfstoffverdünnung von 1:50 beimpften Federfollikel Impfpocken hervor.
Nach 2-monatiger Aufbewahrung bei + 4° C gingen die Impfpocken zu 79 % an, während nach 4-monatiger Lagerung nur noch zu 22 % Impfpocken entstanden.
Dieser beschleunigte Wirksamkeitsabfall läßt auf eine Schädigung des Virus durch die Einwirkung von + 37° C schließen und zeigt, daß weniger wirksame Impfstoffe bei einer Aufbewahrung bei + 4° C auch schneller ihre Aktivität verlieren.
Die Schädigung des Virus durch die Brutschrankwärme wurde auch von MAYR und KALCHER (23), VAN ZWOL (35), BURNET (7)

und GRAHAM und BARGER (13) erkannt. Sie macht sich besonders bemerkbar, wenn das virushaltige Material bei Einwirkung von +37° C nicht im Vakuum aufbewahrt wird.

Zusammenfassung

1.) Ein aus T-virushaltigem Hautmaterial hergestellter lyophilisierter Impfstoff zeigte nach 8-monatiger Aufbewahrung bei +4° C in evakuierten Ampullen einen Wirksamkeitsabfall um 20 % in seiner impfpockenerzeugenden Eigenschaft.
Die Bestimmung der Ei-ID 50 ergab nach 12 Monate langer Aufbewahrung bei +4° C einen Virustiter von $10^{-3,64}$.

2.) Ein nach gleichem Verfahren hergestellter, im evakuierten Exsiccator über Calcium chloratum getrockneter T-Impfstoff, der bei +4° C in evakuierten Ampullen aufbewahrt worden war, ließ nach 7-monatiger Lagerung einen Wirksamkeitsabfall erkennen. Er sank nach dieser Zeit in seiner Wirksamkeit etwas langsamer ab als der lyophilisierte Impfstoff, er hatte nach 11 Monaten eine Ei-ID 50 von $10^{-3,35}$.

3.) Ein T-Impfstoff aus gleichem Ausgangsmaterial wie die beiden anderen Impfstoffe, der zunächst 48 Stunden bei +37° C an der Luft und dann im evakuierten Exsiccator über einem hygroskopischen Chemikal getrocknet worden war, rief nach 2-monatiger Lagerung bei +4° C nur an 60 bis 70 % der beimpften Federfollikel Impfpocken hervor. Seine impfpockenerzeugende Wirksamkeit fiel bereits nach 4 Monaten auf 22 % ab. Nach 10 Monaten war der Impfstoff nahezu unwirksam geworden.

4.) Aufgrund der Versuchsergebnisse kann bei unserer Herstellungstechnik damit gerechnet werden, daß bei einer Aufbe-

wahrung bei +4° C in evakuierten Ampullen ein gut wirksamer Impfstoff, einerlei ob er lyophil oder im Vakuum im Exsiccator über einem hygroskopischen Mittel getrocknet wurde, 8 Monate lang seine anfängliche Wirksamkeit behält.

Ein wesentlicher Unterschied in der Haltbarkeit ergab sich zwischen den beiden auf verschiedene Weise getrockneten Impfstoffen nicht, jedoch schien der Wirksamkeitsabfall bei dem im Vakuum über einem hygroskopischen Mittel getrockneten Impfstoff etwas langsamer als bei dem lyophilisierten Impfstoff vonstatten zu gehen.

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

(1) Bakteriologisches Institut Dr. Rentschler & Co. Laupheim / Württ. — Impfstoff-Prospekt und persönliche Mitteilung

(2) Baumann, R. — "Beitrag zur aktiven Immunisierung gegen Pocken und Diphterie der Hühner" Arch.wiss.prakt.Tierhk.57.299 (1928)

(3) Beaudette, F.R. — in Biester,H.E. u. L.H.Schwarte "Diseases of Poultry" 2.ed. Ames,Iowa: The Iowa State College Press 1948. S.586

(4) Beaudette, F.R., B.R. Miller u. J.A. Bivins u. C.B. Hudson — "The viability of dried viruses of avian origin" Amer.J.Vet.Res. 9,190 (1948)

(5) Behringwerke, Marburg / Lahn — Impfstoff-Prospekt

(6) Bryan, H.S. — "Immunogenic properties of Borreliota avium suspended in buffered glycerol and mineral oil" Amer.J.Vet.Res. 10,284 (1949)

(7) Burnet, E. — "Contribution à l'étude de l'epithelioma contagieux des oiseaux" Ann.Inst.Pasteur (Paris) 20,742 (1906)

(8) Cordier-Boullangier, G., A. Dunais u. B. Harouni — "Vaccinations simultanées contre la maladie de Newcastle et la variole aviaire par virus vivants" Recueil méd.vét. 131, 341 (1955)

(9) Coulston, F.u. R.D. Manwell — in Biester,H.E. u. L.H.Schwarte "Diseases of Poultry" 2.ed. Ames,Iowa: The Iowa State College Press 1948. S.586

(10) Cunningham, Ch.H. in Biester,H.E. u. L.H.Schwarte "Diseases of Poultry" 2.ed. Ames,Iowa: The Iowa State College Press 1948. S. 585

(11) Fritzsche, K. u. E. Gerriets "Geflügelkrankheiten" Bln : Verl.Parey 1959. S.91-108

(12) Goldhaft, T. "Viability of pox and laryngotracheitis vaccines" Avian Diseases 5, 196 (1961)

(13) Graham, R. u. E.H. Barger in Biester,H.E. u. L.H.Schwarte "Diseases of Poultry" 2. ed. Ames,Iowa: The Iowa State College Press 1948. S. 586

(14) Graham, R. u. C.A. Brandley in Biester,H.E. u. L.H.Schwarte "Diseases of Poultry" 2.ed. Ames,Iowa: The Iowa State College Press 1948. S. 586

(15) Graham, R., C.A. Brandley u. N.D. Levine in Biester,H.E. u. L.H.Schwarte "Diseases of Poultry" 2.ed. Ames,Iowa: The Iowa State College Press 1948. S. 587

(16) Hartwigk, H. u. H.-J. Bengelsdorff "Auswertversuche an Taubenpokkenvirus-Impfstoffen" Tierärztl.Umschau 15,122 (1960)

(17) Hartwigk, H. u. M. Krasselt "Beziehungen zwischen Impfreaktion und Immunität bei Hühnerpocken" Mhefte Tierhk. 11, 227 (1959)

(18) Hartwigk, H. u. F. Täubrich "Geflügelpocken-Impfstoff" Mhefte Tierhk. 11, 61 (1959)

(19) Heelsbergen, T. van "Handbuch der Geflügelkrankheiten und der Geflugelzucht" Stuttgart: Verl.Enke 1929.S.234

(20) Impfstoffwerk Friesoythe Dr. Meiners & Co. Friesoythe / Oldbg. Impfstoff-Prospekt

(21) Loewenthal, W. in Biester,H.E. u. L.H.Schwarte "Diseases of Poultry" 2.ed. Ames,Iowa: The Iowa State College Press 1948. S. 586

(22) Marx, E. u. A. Sticker "Weitere Untersuchungen über die Mitigation des Epithelioma contagiosum des Geflügels" Dtsch.med.Wschr. 29, 79 (1903)

(23) Mayr, A. u. K. Kalcher "Vergleichende Studien über die Züchtung von Geflügelpockenviren in der Zellkultur" Arch.Virusforsch. 10, 96 (1961)

(24) Mc Culloch, E.C. in Biester,H.E. u. L.H.Schwarte "Diseases of Poultry" 2.ed. Ames,Iowa: The Iowa State College Press 1948. S. 586

(25) "NOBILIS" Arzneimittel GmbH Impfstoff-Prospekt Aulendorf / Württ.

(26) Otta, J. "Die aktive Immunisierung von Hühnern und Tauben gegen Geflügelpocken mit "Neo-Avisan-T" Mhefte Vet.med. 12, 249 (1957)

(27) Peters, G. "Untersuchungen über die Wirksamkeit verschiedener über die Taube hergestellter Hühnerpocken-Impfstoffe" Bln. FU. vet.med.Diss. 1962

(28) Reed, L.J. u. H. Muench "A simple method of estimating fifty per cent endpoints" Amer.J.Hyg. 27, 493 (1938)

(29) Reischauer, O. von "Ueber die Pocken der Vögel ihre Beziehungen zu den echten Pocken und ihren Erregern" Zbl.Bakt.Abt.I.Orig. 40, 356 (1906)

(30) Richter, J. "Enkele onderzoekingen naar de houdbaaheid van duivenpokkenvirus" Tschr. Diergeneesk. 83, 211 (1958)

(31) Robbins, B.H. in Biester,H.E. u. L.H.Schwarte "Diseases of Poultry" 2.ed. Ames,Iowa: The Iowa State College Press 1948. S. 587

(32) Tsubahara, H., H. Sazawa, T. Kataoka, M. Chisatsune u. H. Kawamura "Some experiments on freeze-dried fowl pox vaccine" Bull.Nat.Inst.Animal Health 56, 43 (1958)

(33) "Vemie" Veterinär Chemie GmbH Kempen / Nrh. Impfstoff-Prospekte

(34) Zwick, W., O. Seifried u. J. Schaaf "Zur Frage der Schutzimpfung gegen Hühnerpocken- und Diphterie" Berliner tierärztl.Wschr.44,433 (1928)

(35) Zwol, H.S. van "Over het standaardiseren van het duivenvirus-vaccin tegen diphterie en Pokken der Kippen" Utrecht, vet.med.Diss. 1949

Für das gestellte Thema, seine Ratschläge und die gewährte Unterstützung, sowohl bei den Versuchen als auch bei der Anfertigung der Arbeit, bin ich Herrn Prof.Dr.H. H a r t w i g k zu Dank verpflichtet.

Viele Anregungen und praktische Hinweise verdanke ich Herrn Dr. H.-J. B e n g e l s d o r f f .

L e b e n s l a u f

Am 15. April 1938 wurde ich als Sohn des Ingenieurs Kurt Stottmeier und seiner Ehefrau Anna, geborene Krumbholz, in Magdeburg geboren.

Von 1945 bis 1951 besuchte ich in Magdeburg die Grundschule. Im Jahre 1951 kam ich dort auf die Otto-von-Guericke-Oberschule, wo ich 1955 die Reifeprüfung ablegte.

Da mir ein Studienplatz an der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig versagt wurde, besuchte ich in Berlin-Steglitz von 1955 bis 1956 den Sonderlehrgang für Ostabiturienten. Nachdem mir auf diesem Wege die Hochschulreife für die Bundesrepublik und West-Berlin erteilt worden war, begann ich im Wintersemester 1956/57 mit dem veterinärmedizinischen Studium an der Tierärztlichen Hochschule Hannover.

Im Herbst 1958 bestand ich an der Veterinärmedizinischen Fakultät der Freien Universität Berlin die Tierärztliche Vorprüfung und im Herbst 1961 die Tierärztliche Prüfung. Seit dem 1.November 1961 bin ich als Veterinär-Praktikant in der tierärztlichen Außenklinik der Freien Universität Berlin tätig.